

⑤

Int. Cl. 2:

**G 01 N 27/48**

①⑨ **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

G 01 N 27/30

G 01 N 27/40

G 01 N 31/14

**DEUTSCHES**



**PATENTAMT**

**Behördenigenschaft**

**DE 29 03 216 A 1**

⑪

# **Offenlegungsschrift 29 03 216**

⑫

Aktenzeichen:

P 29 03 216.4

⑬

Anmeldetag:

27. 1. 79

⑭

Offenlegungstag:

2. 8. 79

⑳

Unionspriorität:

③② ③③ ③①

28. 1. 78 Japan P 8590-78

⑤④

Bezeichnung:

Enzymelektrode und immobilisiertes Enzym enthaltende Membran

⑦①

Anmelder:

Toyo Boseki K.K., Osaka (Japan)

⑦④

Vertreter:

Schönwald, K., Dr.-Ing.; Eishold, K.W., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.;  
Fues, J.Fr., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Kreisler, A. v., Dipl.-Chem.;  
Keller, J.C., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.;  
Werner, H.-K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Pat.-Anwälte,  
5000 Köln und 6232 Bad Soden

⑦②

Erfinder:

Yoda, Kentaro, Otsu, Shiga; Urakabe, Rintaro, Shiga;  
Tsuchida, Toshio, Otsu, Shiga (Japan)

**DE 29 03 216 A 1**

2903216

VON KREISLER    SCHÖNWALD    EISHOLD    FUES  
VON KREISLER    KELLER    SELTING    WERNER

PATENTANWÄLTE

Dr.-Ing. von Kreisler † 1973

Dr.-Ing. K. Schönwald, Köln

Dr.-Ing. K. W. Eishold, Bad Soden

Dr. J. F. Fues, Köln

Dipl.-Chem. Alek von Kreisler, Köln

Dipl.-Chem. Carola Keller, Köln

Dipl.-Ing. G. Selting, Köln

Dr. H.-K. Werner, Köln

DEICHMANNHAUS AM HAUPTBAHNHOF

D-5000 KÖLN 1

AvK/Ax

Toyo Boseki Kabushiki Kaisha, No. 1-9, Dojimahamadouri  
2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka-fu (Japan).

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 1) Für die polarographische Bestimmung einer geringen Konzentration einer Komponente in einer Testlösung geeignete Enzymelektrode mit einer Anode, einer Kathode, einer immobilisierten Enzym enthaltenden Membran und einem Elektrolyten, gekennzeichnet durch eine ein immobilisiertes Enzym enthaltende Membran, die aus einer dichten Hautschicht und einer porösen Schicht besteht und in der das Enzym an der porösen Schicht der Membran immobilisiert ist, wobei die Hautschicht selektive Permeabilität für Wasserstoffperoxid hat und die das immobilisierte Enzym enthaltene Membran so angeordnet ist, daß die Hautschicht der Anode zugewandt ist und die das immobilisierte Enzym enthaltende poröse Schicht mit der Testlösung in Berührung ist.

909831/0801

- 2) Enzymelektrode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran eine Dicke von 5 bis 50  $\mu\text{m}$  und die Hautschicht eine Dicke von nicht mehr als 5  $\mu\text{m}$  hat.
- 3) Enzymelektrode nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Oxidoreduktase ist, die mit dem Substrat unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid reaktionsfähig ist oder Wasserstoffperoxid zu verbrauchen vermag.
- 4) Ein immobilisiertes Enzym enthaltende Membran, die als Enzymelektrode für die polarographische Bestimmung einer geringen Konzentration einer Komponente in einer Testlösung geeignet ist, gekennzeichnet durch eine dichte Hautschicht mit selektiver Permeabilität für Wasserstoffperoxid und eine poröse Schicht, in der ein Enzym immobilisiert ist, wobei die Hautschicht einer Anode zugewandt und die das immobilisierte Enzym enthaltende poröse Schicht so angeordnet ist, daß sie mit der Testlösung in Berührung ist.
- 5) Immobilisiertes Enzym enthaltende Membran nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran eine Dicke von 5 bis 50  $\mu\text{m}$  und die Hautschicht eine Dicke von nicht mehr als 5  $\mu\text{m}$  hat.
- 6) Immobilisiertes Enzym enthaltende Membran nach Anspruch 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Oxidoreduktase ist, die mit dem Substrat unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid reaktionsfähig ist oder Wasserstoffperoxid zu verbrauchen vermag.

Enzymelektrode und immobilisiertes Enzym enthaltende  
Membran

Die Erfindung betrifft eine polarographische Zelle, die die mit einer immobilisiertes Enzym enthaltenden Membran versehen ist, insbesondere eine Enzymelektrode zur Bestimmung von Wasserstoffperoxid mit einer Anode, einer  
5 Kathode, einer immobilisiertes Enzym enthaltenden Membran mit ganz spezieller Struktur und einem Elektrolyten, wobei die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran so angeordnet ist, daß sie der Anode zugewandt ist.

10 Es gibt allgemein angewendete Methoden zur selektiven Bestimmung einer sehr geringen Menge verschiedener Komponenten wie Glucose, Harnstoff, Harnsäure, Triglyceride, Phospholipide, Kreatinin, Aminosäuren, Milchsäure, Xanthin, Chondroitin, Transaminase usw.,  
15 die in Körperflüssigkeiten, Körpergewebe, Nahrungsmitteln o.dgl. enthalten sind.

Enzyme weisen im allgemeinen Spezifität gegenüber ihrem Substrat auf und wirken unter milden Bedingungen selektiv darauf ein, so daß sie vorteilhaft für die Be-  
20 stimmung der vorstehend genannten Komponenten ohne Verwendung eines spezifischen Reagens sowie ohne jedes Problem hinsichtlich Umweltverunreinigung verwendet werden. Andererseits weisen die Enzyme einige Nachteile auf: Sie sind chemisch und physikalisch instabil, und  
25 die Bestimmungsmethode ist sehr kompliziert. Zur Ausschaltung der Nachteile wurde vorgeschlagen, das Enzym zu immobilisieren. Ferner wurde vorgeschlagen, die immobilisierten Enzyme in der Polarographie zu verwenden, die für die elektrochemische Bestimmung von Komponenten, die in geringer Menge in Untersuchungsproben  
30 enthalten sind, vorteilhaft ist (japanische Patentver-

909831/0801

öffentlichung 28672/1972). Hierzu wird eine Enzymelektrode, die mit einer immobilisierten Enzym enthaltenden Membran versehen ist, mit einer zu analysierenden Lösung in Berührung gebracht, wodurch das Enzym mit dem Substrat umgesetzt und eine mit einer Elektrode nachweisbare Substanz, z.B. Wasserstoffperoxyd, gebildet wird. Diese gebildete nachweisbare Substanz wird mit einer Elektrodenzelle bestimmt. In dieser Weise wird die in der Untersuchungslösung enthaltene Komponente polarographisch analysiert. Wenn es sich bei der mit der Elektrode nachweisbaren Substanz um Wasserstoffperoxyd handelt, wird das Wasserstoffperoxyd durch die Anode zersetzt, wodurch ein elektrischer Strom, der der Wasserstoffperoxydmenge proportional ist, durch die polarographische Zelle fließt. Da der Wert des elektrischen Stroms der Menge der zu bestimmenden Komponente proportional ist, kann die Menge der Komponente berechnet werden. Bei der praktischen Durchführung dieser Methode ist es jedoch erforderlich, daß die in der Testlösung enthaltenen störenden Stoffe, die gegenüber der Polarographie aktiv sind, vorher entfernt werden. Wenn beispielsweise Glucose, die im Blut enthalten ist, bestimmt wird, müssen andere für die Polarographie aktive Komponenten, z.B. Harnsäure, Ascorbinsäure, Glutathion und Mercaptoessigsäure, vorher entfernt werden. Um diesen Fehler, der auf diese störenden Stoffe zurückzuführen ist, zu korrigieren, wurde vorgeschlagen, ein Mehrfachelektrodensystem zu verwenden, wodurch das auf die störenden Stoffe zurückzuführende Signal korrigiert wird (japanische Patentveröffentlichung 35360/1970). Dieses System weist jedoch einen komplizierten Elektrodenaufbau und eine komplizierte elektrische Schaltung auf und ist daher kostspielig und störungsanfällig im Betrieb. Es wurde ferner vorgeschlagen, eine Laminatmembran aus einer Membran, die für die zu

bestimmende Substanz selektiv durchlässig ist, einer immobilisierten Enzym enthaltenden Membran und einer Membran zur Entfernung von hochmolekularen Materialien, um niedermolekulare störende Materialien zu eliminieren, zu verwenden (japanische Offenlegungsschrift (ungeprüft) 55691/1977). Es ist jedoch schwierig und umständlich, mehrere Membranen gleichmäßig und genau zu laminieren und zu verkleben. Hierzu sind komplizierte und anspruchsvolle Arbeitsverfahren erforderlich. Die Laminatmembran hat ferner geringe Festigkeit und bricht leicht und schrumpft, so daß es schwierig ist, sie an der Elektrode zu befestigen oder von der Elektrode abzunehmen. Es wurde ferner vorgeschlagen, eine poröse Membran zu verwenden (japanische Offenlegungsschrift (ungeprüft) 17889/1977). Wenn der Porendurchmesser der porösen Membran gering ist, weist sie gute selektive Permeabilität für die bestimmbare Substanz auf, jedoch wird der Kontakt zwischen Substrat und Enzym ungenügend, so daß ungenaue Ergebnisse der Bestimmung die Folge sind. Wenn dagegen die poröse Membran einen großen Porendurchmesser hat, wird die selektive Permeabilität ungenügend, und die störenden Stoffe können ebenfalls hindurchtreten, so daß ebenfalls ungenaue Ergebnisse der Bestimmung erhalten werden.

Es wurde nun gefunden, daß die vorstehend genannten Nachteile der bekannten Methoden und Apparate ausgeschaltet werden können, wenn eine besondere Membran verwendet wird, die eine ganz spezielle Struktur aufweist, bei der eine Oberfläche, die der Elektrode zugewandt ist, glatt und eben und für Wasserstoffperoxyd selektiv durchlässig, aber für das Substrat und die störenden Stoffe undurchlässig ist, und die andere Oberfläche, die der Testlösung zugewandt und mit ihr in Berührung ist, rauh und porös ist, und bei der das

Enzym an der rauhen, porösen Oberfläche der Membran immobilisiert ist.

5 Gegenstand der Erfindung ist eine Enzymelektrode, die mit einer immobilisiertes Enzym enthaltenden Membran mit ganz spezieller Struktur versehen ist. Die Erfindung ist ferner auf eine verbesserte, immobilisiertes Enzym enthaltende Membran gerichtet, die für die polarographische Analyse einer geringen Menge von Komponenten geeignet ist. Die Erfindung umfaßt außerdem 10 eine Methode zur Bestimmung geringer Mengen von Komponenten durch Nachweis von Wasserstoffperoxid, das durch die Reaktion eines Enzyms und des Substrats gebildet oder verbraucht wird, mit Hilfe einer polarographischen Zelle mit einer Anode, einer Kathode, einer 15 immobilisiertes Enzym enthaltenden Membran mit ganz spezieller Struktur und einem Elektrolyten, wobei die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran so angeordnet ist, daß sie der Anode zugewandt ist.

20 Die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran gemäß der Erfindung hat eine ganz spezielle Struktur, bei der eine Oberfläche, die der Elektrode zugewandt ist, dicht ist und eine glatte, ebene Haut bildet, die selektive Permeabilität aufweist und nur für Wasserstoffperoxid durchlässig ist, und bei der die andere Oberfläche 25 porös ist, wobei das Enzym in den Poren der porösen Oberfläche immobilisiert ist. Die das immobilisierte Enzym enthaltende Oberfläche steht mit der Testlösung in Berührung. Das Substrat dringt in die Poren ein und reagiert darin mit dem Enzym unter Bildung von Wasserstoffperoxid. 30

Die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran gemäß der Erfindung weist ausgezeichnete selektive Permeabilität auf und vermag das unerwünschte Hindurchtreten von niedermolekularen störenden Stoffen vollständig zu

verhindern. Sie zeigt ferner ausgezeichneten Kontakt des Enzyms und des Substrats, so daß die Enzymelektrode, die mit der immobilisierten Enzym enthaltenden Membran versehen ist, für die genaue Bestimmung geringer Konzentrationen von Komponenten in Körperflüssigkeiten, Körpergewebe, Nahrungsmitteln o.dgl. geeignet ist. Die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran hat zahlreiche weitere Vorteile:

- 1) Sie weist hohe Festigkeit auf und läßt sich leicht handhaben.
- 2) Da sie aus einer Einzelschicht besteht (d.h. kein Laminat ist), ist sie gleichmäßig und eben und ermöglicht die Ermittlung genauer Bestimmungsdaten mit guter Reproduzierbarkeit.
- 3) Sie kann mit geringen Kosten hergestellt werden.
- 4) Auf Grund des guten Eindringens des Substrats kann die Messung in kurzer Zeit erfolgen.
- 5) Es findet kein Durchschlag statt.

Die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran und die Enzymelektrode gemäß der Erfindung werden nachstehend ausführlich unter Bezugnahme auf die Abbildungen beschrieben.

Fig.1 zeigt schematisch im Schnitt die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran gemäß der Erfindung. Wie die Abbildung zeigt, weist diese Membran 1 eine der Elektrode zugewandte Oberfläche 2, die eine dichte Haut bildet, und eine Oberfläche 3 auf, die der Testlösung zugewandt und rauh und porös ist. Das Enzym 4 ist auf der porösen Oberfläche, insbesondere in den Poren der porösen Oberfläche 3 immobilisiert.

Fig.2 zeigt schematisch als Querschnitt eine Enzym-



elektrode für die Polarographie. Diese Elektrode ist mit einer erfindungsgemäßen, immobilisiertes Enzym enthaltenden Membran versehen. Hierbei ist 5 eine Anode, 6 eine Kathode, 7 ein isolierter Halter für die Elektrode und 8 ein Elektrolyt, d.h. eine Testlösung. Wie Fig.2 zeigt, ist die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran 1 gemäß der Erfindung im Polarographen so angeordnet, daß die Oberfläche 2 der Elektrode zugewandt und die poröse Oberfläche 3 mit der zu analysierenden Testlösung in Berührung ist. An der porösen Oberfläche 3 reagiert das auf der porösen Oberfläche immobilisierte Enzym 4 mit dem in der Testlösung enthaltenen Substrat unter Bildung einer durch die Elektrode nachweisbaren Substanz, nämlich Wasserstoffperoxid, und das hierbei gebildete Wasserstoffperoxid durchdringt die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran 1 und wird an der Anode 5 zersetzt, wodurch die Menge des Wasserstoffperoxids polarographisch bestimmt wird. Die Anode besteht gewöhnlich aus Platin, kann jedoch auch aus Gold bestehen. Die Kathode besteht gewöhnlich aus Silber, kann jedoch auch aus Silber-Silberchlorid bestehen.

Die Membran wird aus hochmolekularen Verbindungen, d.h. Homopolymeren oder Copolymeren, beispielsweise Polyamiden, Polyurethanen, Celluloseacetat, Cellulose, Polyäthylenimin, Polyvinylalkohol, Polycarbonaten, Polymethylmethacrylat oder Polyacrylnitril, hergestellt. Bevorzugt als hochmolekulare Verbindungen werden hydrophile hochmolekulare Verbindungen, z.B. Polyamide, Celluloseacetat und Polyvinylalkohol.

Die Membran mit der speziellen Struktur kann nach verschiedenen Verfahren hergestellt werden. Beispielsweise wird die als Ausgangsmaterial verwendete hochmolekulare Verbindung in einem Lösungsmittel (z.B. Aceton) gelöst, und die hierbei erhaltene Lösung wird auf einer Grund-

platte mit glatter Oberfläche, beispielsweise einer Glasplatte, Kunststoffplatte oder Metallplatte, zu einer dünnen Folie gegossen. Das Lösungsmittel wird in kurzer Zeit verdampft, wobei auf der Grundplatte eine Hautschicht mit selektiver Permeabilität gebildet wird. Die erhaltene Membran wird in ein Lösungsmittel getaucht, in dem die hochmolekulare Verbindung schwerlöslich oder wenig löslich ist. Hierdurch wird die in der Membran enthaltene, im Lösungsmittel lösliche hochmolekulare Verbindung entfernt und eine an die Hautschicht angrenzende poröse Schicht gebildet (japanische Offenlegungsschrift (ungeprüft) 94482/1976 und US-PSen 3 133 132 und 3 133 133). Die Membran kann auch hergestellt werden, indem eine poröse Membran mit durchgehenden Poren aus der als Ausgangsmaterial dienenden hochmolekularen Verbindung nach üblichen Verfahren, beispielsweise durch Elution, Gießen oder Recken, gebildet, eine Oberfläche der hierbei erhaltenen porösen Membran mit einem Lösungsmittel, das die als Ausgangsmaterial dienende hochmolekulare Verbindung zu lösen vermag, behandelt und hierdurch die Hautschicht auf der Oberfläche gebildet wird (japanische Offenlegungsschrift 69476/1977). Nach einem anderen Verfahren kann die Membran durch Bildung einer dünnen Schicht auf einer Oberfläche einer porösen Membran hergestellt werden, indem die poröse Membran einer Plasmapolymerisation in einem Inertgas unterworfen wird (J.R.Hollaman und T.Wydeven in J.Appl.Polymer Sci. 21 (1977) 923 und japanische Patentveröffentlichung 32755/1977). Die Membran kann auch wie folgt hergestellt werden: Eine Membran aus einer hochmolekularen Verbindung, die durch Recken keine feinen Risse bildet, wird auf einer Oberfläche einer Membran aus einer hochmolekularen Verbindung, bei der durch Recken feine Risse gebildet werden, gebildet. Anschließend

909831/0801

wird die erhaltene zweischichtige Membran gereckt, wodurch zahlreiche feine Risse in der letztgenannten Membran gebildet werden. (Japanische Offenlegungsschriften 119069/1976, 135974/1976 und 135975/1976).

- 5 Die Membran hat vorzugsweise eine Dicke von 5 bis 50  $\mu\text{m}$ , insbesondere von 10 bis 20  $\mu\text{m}$ . Die Hautschicht der Membran mit ausgezeichneter selektiver Permeabilität (undurchlässig für das Substrat und durchlässig nur für das Wasserstoffperoxid) hat vorzugsweise eine Dicke
- 10 von nicht mehr als etwa 5  $\mu\text{m}$ , insbesondere nicht mehr als 1  $\mu\text{m}$ . Besonders bevorzugt wird für die Hautschicht eine Dicke im Bereich von 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$ .

- Als Enzyme, die auf der porösen Oberfläche der Membran zu immobilisieren sind, kommen verschiedene Oxidoreduktasen in Frage, die mit dem Substrat unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid reaktionsfähig sind oder Wasserstoffperoxid durch eine enzymatische Reaktion zu verbrauchen vermögen, z.B. Glucoseoxidase, Galactoseoxidase, Uricase, Cholesterinoxidase, Cholinoxidase, 1-Aminosäureoxidase, d-Aminosäureoxidase, Xanthinoxidase, Alkoholoxidase, Aldehydoxidase, Milchsäureoxidase, Brenztraubensäureoxidase und Peroxidase.
- 15 Geeignet sind auch Enzyme oder Coenzyme, die Wasserstoffperoxid durch eine enzymatische Reaktion nicht direkt freisetzen oder verbrauchen, sondern ein Substrat für eine enzymatische Reaktion unter Bildung oder Verbrauch von Wasserstoffperoxid bilden, z.B. Lipase, Lipoproteinlipase, Phospholipase, Cholesterinesterase,  $\beta$ -Galactosidase und Mutarotase. An Stelle der Enzyme selbst können
- 20 Mikroorganismen oder Organellen, die Enzyme enthalten, immobilisiert werden.
- 25
- 30

Die Immobilisierung des Enzyms auf der Membran kann nach üblichen Verfahren erfolgen. Beispielsweise wird bei chemischen Bindungsverfahren, z.B. beim Verfahren

der kovalenten Bindung, nach dem Ionenbindungsverfahren oder Vernetzungsverfahren, das Enzym an die in der die Membran bildenden Verbindung enthaltene Aminogruppe, Hydroxylgruppe o.dgl. mit Hilfe eines Vernetzungsmittels, beispielsweise Glutaraldehyd oder Hexamethylen-diisocyanat, gebunden. Die Immobilisierung des Enzyms kann auch durch direkte Reaktion der im Enzym enthaltenen Carboxylgruppe und einer Aminogruppe oder anderen in der die Membran bildenden Substanz enthaltenen reaktionsfähigen Gruppe erfolgen. Das Enzym kann auch immobilisiert werden, indem zuerst die in der die Membran bildenden Substanz enthaltene Hydroxylgruppe durch Modifizierung mit einem Säureazid oder durch Imidocarbonisation oder Carbonisation aktiviert und dann das Enzym damit umgesetzt wird. Die Immobilisierung des Enzyms kann auch nach einem physikalischen Adsorptionsverfahren erfolgen, bei dem man beispielsweise einen Träger (z.B. Kaolinit, Calciumphosphatgel, Stärke oder Gluten) in die poröse Oberfläche der Membran eindringen und dann das Enzym darin eindringen läßt oder indem man das Enzym direkt in die poröse Oberfläche eindringen läßt. Ferner kann das Enzym immobilisiert werden, indem man die poröse Oberfläche der Membran von einem Gemisch eines Enzyms mit einer hochmolekularen Verbindung, die eine aktive Gruppe (z.B. Aminogruppe, Hydroxylgruppe oder Carboxylgruppe) enthält, z.B. Polyamide, Cellulose oder Polyacrylsäure, durchdringen läßt und dann das Enzym mit einem Vernetzungsmittel (z.B. Glutaraldehyd oder Hexamethylen-diisocyanat) vernetzt, oder indem man eine Enzymlösung in die poröse Oberfläche der Membran eindringen läßt und dann das Enzym mit dem vorstehend genannten Vernetzungsmittel direkt mit der Membran vernetzt oder indem man ein Gemisch eines Enzyms und einer hochmolekularen Verbindung, z.B. Protein oder Chitosan, in die

poröse Oberfläche der Membran eindringen läßt und das Gemisch dann durch Behandlung mit einem Alkali geliert.

Die Immobilisierung des Enzyms kann gleichzeitig mit der Bildung der Membran oder nach der Bildung der Membran erfolgen. Wenn gleichzeitig ein anderes Enzym oder Coenzym verwendet wird, kann es in der zu analysierenden Testlösung gelöst oder zusammen mit dem Hauptenzym an der Membran immobilisiert werden.

Die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran gemäß der Erfindung wird in die übliche polarographische Zelle eingesetzt, die mit einer Platinanode, einer Kathode aus Silber-Silberchlorid und Kaliumchlorid als Elektrolyt versehen ist oder eine Platinanode, eine Silberkathode und Natriumacetat als Elektrolyt aufweist. Andere polarographische Zellen können ebenfalls verwendet werden.

Die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran gemäß der Erfindung weist ausgezeichnete selektive Permeabilität, Stabilität und enzymatische Aktivität auf. Die mit der das immobilisierte Enzym enthaltenden Membran versehene Enzymelektrode eignet sich somit zur Bestimmung geringer Konzentrationen von Komponenten, die im Blut, Urin, in Körpergeweben, Nahrungsmitteln o.dgl. enthalten sind. Die Enzymelektrode ermöglicht die Bestimmung mit großer Genauigkeit und niedrigen Kosten innerhalb sehr kurzer Zeit unter Verwendung einer geringen Menge der zu untersuchenden Probe.

Die mit der das immobilisierte Enzym enthaltenden Membran versehene Enzymelektrode gemäß der Erfindung eignet sich ferner zur kontinuierlichen Überwachung von Blutzuckerwerten. Wenn jedoch in diesem Fall die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran längere Zeit mit der Blutprobe in Berührung bleibt, haften gelegentlich einige Blutbestandteile an der Membran, wodurch die

909831/0801

Leistung der Membran verschlechtert wird. Um diese unerwünschte Erscheinung zu vermeiden, wird die Oberfläche der das immobilisierte Enzym enthaltenden Membran vorzugsweise mit einer porösen Schutzmembran mit gerinnungshemmender Eigenschaft bedeckt. Diese poröse Membran sollte ausgezeichnete Durchlässigkeit für das Substrat aufweisen und hat vorzugsweise einen Porendurchmesser von 0,01 bis 0,5  $\mu\text{m}$ . Sie wird aus gerinnungshemmenden Substanzen wie Polyurethan, Polyamiden, Polyvinylalkohol, Celluloseacetat, Polycarbonaten, Siliconen und Polyestern, die mit Heparin modifiziert sind, hergestellt.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert.

- 15

Beispiel 1

2 g Celluloseacetat wurden in 50 ml eines Lösungsmittelgemisches aus 30 ml Aceton und 20 ml Cyclohexanon gelöst. Das Gemisch wurde mit einer Rakel in Form eines Films einer Dicke von 300  $\mu\text{m}$  auf eine Glasplatte aufgebracht. Das Produkt wurde 10 Minuten an der Luft stehen gelassen und dann in n-Hexan getaucht, um das Lösungsmittel zu extrahieren. Nach dem Trocknen an der Luft wurde die in dieser Weise gebildete Folie von der Glasplatte abgestreift, wobei eine weiße Membran einer Dicke von 13  $\mu\text{m}$  erhalten wurde. Diese Membran wies eine dichte Hautschicht (1  $\mu\text{m}$ ) und eine poröse Schicht auf. Die Haut war für Wasserstoffperoxid leicht durchdringbar, jedoch völlig undurchlässig für Harnsäure, Ascorbinsäure und Glucose. Dies wurde durch einen Membranpermeabilitätstest bestätigt.

Getrennt hiervon wurden 25 mg Glucoseoxidase (50 IE/mg), 50 mg eines porenbildenden Mittels und 75 mg Albumin in 8 ml 0,05-molarem Natriumacetatpuffer (pH 5,1) gelöst. Der Lösung wurden 0,3 ml 25%ige wässrige Glutar-

909831/0801

aldehydlösung unter Bildung einer Enzymlösung zugesetzt.

Die in dieser Weise erhaltene Enzymlösung ließ man in die poröse Oberfläche der in der beschriebenen Weise hergestellten Membran eindringen. Durch Stehenlassen der in dieser Weise behandelten Membran für 8 Stunden bei 5°C wurde das Enzym an der porösen Oberfläche der Membran vollständig immobilisiert. Die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran wurde mit Natriumacetatpuffer gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die in der beschriebenen Weise hergestellte, immobilisierte Enzym enthaltende Membran wurde an einer Clarke-Wasserstoffperoxidelektrode so befestigt, daß die Hautschicht der Elektrode am Kopfteil der Elektrode zugewandt war und die poröse Schicht, die das immobilisierte Enzym enthielt, sich an der der Elektrode abgewandten Seite befand (d.h. mit der Testlösung in Berührung war), wie in Fig.2 dargestellt.

Die so gebildete Enzymelektrode wurde in eine Zelle getaucht, die 0,5 ml 0,05-molaren Phosphatpuffer (pH 7,0) enthielt. Dem Puffer wurden unter Rühren 10 µl einer Glucosestandardlösung (100 bis 700 mg/dl) mit einer Mikropipette zugesetzt. Mit Hilfe eines Polarographen (YSI, Typ 25, Oxidasemesser), der mit der Elektrode verbunden war, wurden der Strom, der auf das durch die enzymatische Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid zurückzuführen war, und die Veränderung mit der Zeit gemessen. Der elektrische Strom erreichte nach 20 Sekunden einen konstanten Wert. In Fig. 3 ist die Beziehung zwischen der Stromstärke beim Maximum, bevor ihr Wert konstant wurde (Ordinate), und der Konzentration der Glucosestandardlösung (Abszisse) dargestellt. Wie diese Abbildung zeigt, besteht eine gute geradlinige Beziehung zwischen der Glucosekonzentration und der Stromstärke, so daß es möglich ist, un-

909831/0801

bekannte Konzentrationen der Glucose zu bestimmen.

- Wenn 10  $\mu$ l einer Lösung, die 100 mg Harnsäure/dl und 100 mg Ascorbinsäure/dl enthielt, an Stelle der Glucosestandardlösung in die Zelle gegeben wurde, wurde
- 5 keine Reaktion an der Elektrode beobachtet. Dieser Test bestätigte, daß die gemäß diesem Beispiel hergestellte Enzymelektrode durch polarographisch aktive störende Stoffe nicht gehemmt wurde.

#### Beispiel 2

- 10 Unter Verwendung der in Beispiel 1 beschriebenen Enzymelektrode wurden 10  $\mu$ l einer Probe von menschlichem Blut an Stelle der Glucosestandardlösung in die Zelle gegeben. Die Glucosekonzentration im menschlichen Blut wurde auf die in Beispiel 1 beschriebene Weise
- 15 gemessen. Auf der Grundlage der für die Glucosestandardlösung aufgenommenen Eichkurve wurde ein Blutzuckerwert der Testprobe von 175 mg/dl berechnet.

Die gleiche Blutprobe (10  $\mu$ l) wurde einem Phosphatpuffer (0,5 ml) zugesetzt, der Harnsäure (10 mg/dl) enthielt.

- 20 Das Gemisch wurde in der gleichen Weise behandelt. Hierbei wurde ein Blutzuckerwert von 172 mg/dl ermittelt. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Harnsäure als störendes Material keinen Einfluß auf die Messung hatte.

#### Beispiel 3

- 25 5 Gew.-Teile Polyhydroxyäthylmethacrylat, das durch Polymerisation von Hydroxyäthylmethacrylat in Benzol unter Verwendung von Benzoylperoxid als Initiator hergestellt worden war, 90 Gew.-Teile Methyläthylketon und 5 Gew.-
- 30 Teile Isopropylalkohol wurden gemischt, wobei eine Polymerlösung gebildet wurde. Diese Polymerlösung wurde auf eine glatte Glasplatte in einer Dicke von



150  $\mu\text{m}$  gerakelt. Nach dem Trocknen an der Luft bei Raumtemperatur für 10 Minuten wurde das erhaltene Produkt in kaltes Wasser getaucht und die Folie von der Glasplatte abgestreift, wobei eine milchigweiße, klare  
5 Membran mit unterschiedlichen Oberflächen und einer Dicke von 7,9  $\mu\text{m}$  erhalten wurde.

Eine wässrige Cholinioxidaselösung ließ man in die Poren der porösen Oberfläche der in der beschriebenen Weise hergestellten asymmetrischen Membran eindringen. Die  
10 behandelte Membran wurde an der Luft getrocknet und mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) gewaschen. Die wässrige Cholinioxidaselösung wurde durch Auflösen von 10 mg Cholinoxidase (6,2 IE/mg), 20 mg Rinderserumalbumin und 0,05 ml einer 25%igen wässrigen Glutaraldehydlösung  
15 in 2 ml eines 0,05-molaren Kaliumphosphatpuffers (pH 7,5) hergestellt.

Die die immobilisierte Cholinoxidase enthaltende Membran wurde an einer Clarke-Wasserstoffperoxidelektrode mit einer Platinanode und einer Silberkathode auf die  
20 in Beispiel 1 beschriebene Weise angebracht.

10  $\mu\text{l}$  menschliches Blutserum wurde zu 1 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) gegeben, der 0,5 mg Phospholipase D (6,5 IE/mg) enthielt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 37°C erhitzt, wodurch die im Blutserum enthaltenen  
25 Phospholipide unter Bildung von freiem Cholin hydrolysiert wurden. Das Gemisch wurde in die polarographische Zelle überführt, in der das durch die Oxidation des Cholins als Folge der enzymatischen Reaktion (37°C) mit der Enzymelektrode gebildete Wasserstoffperoxid  
30 polarographisch gemessen wurde. Auf der Grundlage einer vorher mit Cholinchlorid-Standardlösung (1 bis 1000 mg/dl) aufgenommenen Eichkurve wurde die im zu untersuchenden Blutserum enthaltene Menge der Phospholipide mit 281 mg/dl berechnet. Wenn das gleiche Blutserum

nach der üblichen Hoeflmayer-Fried-Methode untersucht wurde, wurde ein Phospholipidgehalt von 285 mg/dl berechnet. Die beiden Werte stimmten gut überein.

#### Beispiel 4

5 10 Gew.-Teile Polymetaphenylenisophthalamid (relative Viskosität ( $\eta_{rel}$ ) einer 1%igen Lösung in Dimethylformamid 1,47 bei 30°C), 85 Gew.-Teile Dimethylacetamid und 5 Gew.-Teile Lithiumchlorid wurden gemischt. Das Gemisch wurde in einer Dicke von 100  $\mu$ m auf eine  
10 glatte Glasplatte gerakelt. Die beschichtete Glasplatte wurde 2 Minuten im Wärmeschrank bei 100°C in waagerechter Lage gehalten und dann in kaltes Wasser getaucht. Die hierbei gebildete Folie wurde von der Glasplatte abgestreift, wobei eine milchigweiße, klare  
15 Membran mit unterschiedlichen Oberflächen und einer Dicke von 11,2  $\mu$ m erhalten wurde.

In die Poren der porösen Oberfläche der erhaltenen asymmetrischen Membran ließ man eine Enzymlösung eindringen. Die behandelte Membran wurde an der Luft getrocknet. Die Enzymlösung wurde durch Auflösen von  
20 20 mg Uricase (3,5 IE/mg) und 100 mg Chitosan in 5 g einer 2%igen wässrigen Essigsäurelösung hergestellt.

Die die Uricase enthaltende Membran wurde in einen Boratpuffer (pH 10) und dann in einen Boratpuffer  
25 (pH 9) getaucht, wodurch das Enzym immobilisiert wurde.

Die die immobilisierte Uricase enthaltende Membran wurde an einer Clarke-Wasserstoffperoxidelektrode, die eine Platinanode und eine Silberkathode an ihrem Kopfteil aufwies, auf die in Beispiel 1 beschriebene Weise  
30 angebracht. Die erhaltene Enzymelektrode wurde in eine Zelle getaucht, die 20 ml Boratpuffer (pH 8,4) bei 35°C enthielt.

Menschliches Blutserum (1 ml) wurde mit einer Mikropipette unter Rühren in die Zelle gegeben, in der das durch die enzymatische Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid polarographisch gemessen wurde. Auf der Grundlage einer Eichkurve, die vorher für eine Harnsäurestandardlösung (1 bis 100 mg/dl) aufgenommen war, wurde die im zu untersuchenden Blutserum enthaltene Harnsäuremenge mit 9,0 mg/dl berechnet. Wenn das gleiche Blutserum durch direkte UV-Spektrophotometrie mit üblicher Uricase gemessen wurde, betrug der Gehalt an Harnsäure 8,8 mg/dl. Die beiden Ergebnisse stimmten gut überein.

#### Beispiel 5

5 Gew.-Teile sulfoniertes Polyphenylenoxid (Sulfonierungsgrad 1,12 mg-Äquivalent/1 g Polymerisat), 90 Gew.-Teile Chloroform und 5 Gew.-Teile Isopropylalkohol wurden gemischt. Die hierbei erhaltene Polymerlösung wurde in einer Dicke von 150  $\mu$ m auf eine glatte Glasplatte gerakelt. Nach dem Trocknen für 3 Minuten an der Luft bei Raumtemperatur wurde die beschichtete Platte in Methanol getaucht. Die hierbei gebildete Folie wurde von der Glasplatte abgestreift, wobei eine milchigweiße, klare Membran mit unterschiedlichen Oberflächen und einer Dicke von 7,7  $\mu$ m erhalten wurde.

Glucoseoxidase wurde in der in Beispiel 1 beschriebenen Weise an der in der beschriebenen Weise hergestellten asymmetrischen Membran immobilisiert. Diese Membran wurde in der beschriebenen Weise an der Elektrode angebracht. Die bei dem in Beispiel 2 beschriebenen Versuch verwendete Probe wurde analysiert. Hierbei wurde ein Blutzuckerwert von 173 mg/dl, der mit dem gemäß Beispiel 2 erhaltenen Ergebnis gut übereinstimmte, ermittelt.

Beispiel 6

Polypropylen und Nylon 66 (Gewichtsverhältnis 50:50) wurden geknetet. Aus dem Polymergemisch wurde eine 30  $\mu\text{m}$  dicke Folie durch Schmelzbeschichten hergestellt.

5 Die Folie wurde durch uniaxiales Recken auf die zweifache Länge bei 130°C orientiert, wobei gleichzeitig Risse in der Folie gebildet wurden. Eine Oberfläche der orientierten Folie wurde 10 Minuten der Einwirkung von dampfförmigem n-Hexan bei 100°C ausgesetzt, mit Wasser

10 gewaschen und an der Luft getrocknet, wobei eine Membran mit verschiedenen Oberflächen und einer Dicke von 20  $\mu\text{m}$  erhalten wurde.

Uricase wurde an der erhaltenen asymmetrischen Membran in der in Beispiel 4 beschriebenen Weise immobilisiert.

15 Die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran wurde in der beschriebenen Weise an einer Elektrode angebracht. Die gleiche Probe wie in Beispiel 4 wurde analysiert. Hierbei wurde festgestellt, daß das Blutserum 8,5 mg/dl Harnsäure enthielt. Dieses Ergebnis stimmt

20 mit dem gemäß Beispiel 4 erhaltenen Ergebnis gut überein.

Beispiel 7

5 Gew.-Teile Nylon 6 (relative Viskosität einer 1%igen Lösung in 96%iger Schwefelsäure: 3,41 bei 30°C), 90 Gew.-Teile Ameisensäure und 5 Gew.-Teile Lithium-

25 chlorid wurden gemischt. Die erhaltene Polymerlösung wurde in einer Dicke von 150  $\mu\text{m}$  auf eine saubere glatte Glasplatte gegossen. Nach Stehenlassen im Wärmeschrank für 5 Minuten bei 100°C in waagerechter Lage wurde die beschichtete Platte in kaltes Wasser ge-

30 taucht. Die hierbei gebildete Folie wurde von der Glasplatte abgestreift, wobei eine milchigweiße, klare Membran mit verschiedenen Oberflächen und einer Dicke von 8,7  $\mu\text{m}$  erhalten wurde.

Die poröse Oberfläche der erhaltenen Membran wurde durch Behandlung mit Dimethylsulfat bei 100°C für 3 Minuten aktiviert, dann mit Methanol gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Die aktivierte  
5 Oberfläche der Membran wurde 2 Stunden in eine 0,1-molare wässrige Lysinlösung (pH 9,5) getaucht und dann mit 0,5-molarer wässriger Natriumchloridlösung gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 2,5%iger  
10 Glutaraldehydlösung in 0,1-molarem Natriumborat (pH 8,5) behandelt, mit Methanol gewaschen und dann unter vermindertem Druck getrocknet.

Auf die Membran, in die Aldehydgruppen eingeführt worden waren, wurde eine Lösung von 6,25 mg Cholesterinoxidase (10 IE/mg) in 1 ml 0,05-molarem Phosphatpuffer (pH 7,0)  
15 gegossen. Nach 12-stündiger Reaktion bei 4°C wurde die Membran 5 Stunden bei Raumtemperatur gehalten und mit Phosphatpuffer gewaschen, wobei eine immobilisierte Enzym enthaltende Membran erhalten wurde.

Die das immobilisierte Enzym enthaltende Membran wurde  
20 an einer Wasserstoffperoxidelektrode so angebracht, daß die Hautschicht der Membran der Elektrode zugewandt war. Die Enzymelektrode wurde in 350 ml eines 0,05-molaren Natriumacetatpuffers (pH 5,1) bei 37°C getaucht. Dem Puffer wurde menschliches Blut, das eine bekannte  
25 Menge freien Cholesterins (201 mg/dl) enthielt, zugesetzt, worauf der Gehalt an freiem Cholesterin polarographisch gemessen wurde. Die Messung ergab einen Gehalt an freiem Cholesterin von 197 mg/dl.

909831/0801

GEOTOPHIL L. SCHMIDT

Figure 1 <sup>-21-</sup> 2903216

Nummer:  
Int. Cl.2:  
Anmeldetag:  
Offenlegungstag:

29 03 216  
G 01 N 27/48  
27. Januar 1979  
2. August 1979

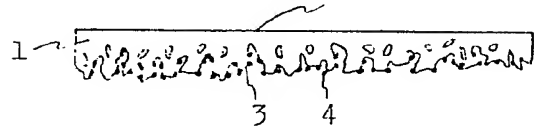


Figure 2

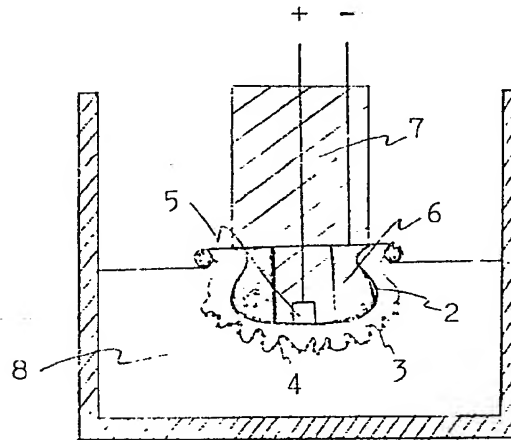
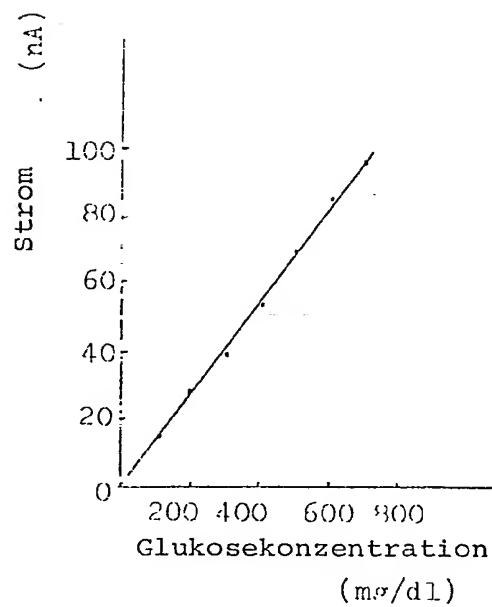


Figure 3



909831/0801

ORIGINAL INSPECTED